

DOI:10.11937/bfyy.201707029

一株链霉菌对猕猴桃溃疡病的防效

王芳¹, 李丹¹, 张信旺², 李继广¹, 周繁¹, 金锡萱²

(1. 沈阳化工研究院有限公司, 辽宁 沈阳 110021; 2. 四川省猕猴桃工程技术研究中心, 四川 成都 611600)

摘要:以猕猴桃溃疡病菌为试菌,采用液体共培养法和含菌抑菌圈法,研究了链霉菌 SY-L12 对猕猴桃溃疡病菌的生长抑制作用,并测定链霉菌发酵液对猕猴桃溃疡病的盆栽防效。结果表明:链霉菌 SY-L12 在培养 24 h 后其发酵液原液对病原菌的生长抑制率达 94.0%,在 28 ℃、150 r·min⁻¹ 培养 8~9 d 条件下最利于活性物质的生产,发酵产物对猕猴桃溃疡病的盆栽防效为 85.4%,优于氢氧化铜对照药剂。表明链霉菌 SY-L12 能够有效抑制猕猴桃溃疡病菌生长,作为生物农药具有开发应用前景。

关键词:链霉菌;猕猴桃溃疡病;抑菌活性;生物防治

中图分类号:S 436.634.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)07-0139-04

猕猴桃溃疡病(kiwifruit bacterial canker)是猕猴桃种植中最具毁灭性的病害,主要由丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)引起,危害症状有叶斑、枝枯、花蕾畸形脱落、皮孔流脓等,病原体沿导管传播,伴随韧皮部、木质

部坏死^[1-2],重病年可爆发成灾,带来严重经济损失。目前国内外研究者正寻求综合解决方案,并将研究热点集中在生物制剂上,对微生物内生放线菌^[3-4]、生防芽孢杆菌、抗菌肽^[5]、生物大分子化合物壳寡糖^[6]都进行了系列活性研究,并取得一定进展,但尚未形成商品化应用,因此仍需要研发多种生物制剂,综合解决猕猴桃溃疡病的危害问题。

该研究利用一株具有广谱抑菌活性的链霉菌 SY-L12(*Streptomyces* sp.),采用高效液体共培养法明确菌株发酵液对猕猴桃溃疡病菌的生长抑制作用,优化出最利于活性物质产生的发酵条件,并通过

第一作者简介:王芳(1981-),女,辽宁沈阳人,博士,高级工程师,研究方向为功能微生物应用。E-mail: wangfang1@sinochem.com.

责任作者:周繁(1982-),女,重庆人,博士,高级工程师,研究方向为作物营养。E-mail: zhoufan03@sinochem.com.

收稿日期:2016-12-13

Potassium Releasing Activity and Identification of LJP21 From Rhizosphere Soil of *Paeonia ostii* 'Fengdan'

SUN Huizhong, SONG Yueqin, WANG Xiaodong, ZHANG Youfu, HOU Xiaogai

(College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

Abstract: Rhizosphere soil of *Paeonia ostii* 'Fengdan' was used as test material. The isolation, activity evaluation and identification of potassium bacteria in the rhizosphere environment of *Paeonia ostii* 'Fengdan' were studied by using dilution plate method. The results showed that four strains LJP3, LJP7, LJP21, LJP23 of potassium bacteria were isolated. After 7 days fermentation under the condition of 28 ℃, 180 r·min⁻¹, the potassium content in fermentation liquid of LJP21 reached a maximum of 2.6 μg·mL⁻¹. By observing the phenotypic characteristics, biochemical characteristics and 16S rDNA analysis, strain LJP21 was determined to belong to the genus *Exiguobacterium*, and tentatively named *Exiguobacterium* sp. LJP21. Strain LJP21 could be used as a reserve strain in fertilizer or biofertilizer development.

Keywords: *Paeonia ostii* 'Fengdan'; potassium bacteria; isolation; identification

测定盆栽活体苗木接种的防治效果,进一步评价其在猕猴桃溃疡病防治中的应用潜力,以期对猕猴桃溃疡病综合解决方案提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株 SY-L12,经鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*, sp),由沈阳化工研究院有限公司生物与医药研究室分离并保藏;猕猴桃溃疡病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) PA-203,由联想佳沃集团提供;供试猕猴桃为一年生实生苗;46%氢氧化铜水分散剂由美国杜邦公司生产。

供试高氏一号培养基用于链霉菌 SY-L12 斜面培养及摇瓶发酵;LB 培养基用于猕猴桃溃疡病菌 PA-203 摇瓶发酵。

1.2 试验方法

1.2.1 链霉菌 SY-L12 发酵液及猕猴桃溃疡病菌 PA-203 菌悬液的制备 将甘油管保藏的链霉菌 SY-L12 菌株接种于高氏一号平板培养基中,放置于 25℃ 培养箱培养 4 d 进行活化,然后接种于高氏一号液体培养基,30℃、120 r·min⁻¹ 振荡培养 10 d,获得链霉菌 SY-L12 发酵液;挑取猕猴桃溃疡病菌 PA-203 菌落接种于 LB 液体培养基中,30℃、150 r·min⁻¹ 振荡培养过夜,离心后去上清液,以无菌水稀释菌体,制备猕猴桃溃疡病菌 PA-203 菌悬液。

1.2.2 链霉菌 SY-L12 对猕猴桃溃疡病的抑菌作用测定 1)采用液体共培养法^[7]。首先将链霉菌 SY-L12 发酵液 6 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,去除菌体,取上清液,用无菌水依次稀释上清液,分别取 1 mL 发酵上清液原液,10、50、100 倍稀释液及无菌水对照加入至 9 mL LB 液体培养基中,混合后各吸取 200 μL 加入到 96 孔板中,每处理 3 次重复,最后接入 2 μL 浓度为 1×10⁷ cfu·mL⁻¹ 猕猴桃溃疡病菌悬液,同时设置 2 μL 无菌水加入 200 μL LB 液体培养基处理为调 0 参比,置于 28℃ 培养箱中,利用酶标仪分别于 12、24 h 测定 600 nm 光波下吸光值,计算抑菌率。抑菌率(%)=(对照组 OD₆₀₀ - 试验组 OD₆₀₀)/对照组 OD₆₀₀×100。2)采用抑菌圈法^[8]。将浓度为 1×10⁷ cfu·mL⁻¹ 猕猴桃溃疡病菌 PA-203 菌悬液与融化后并冷却至 40℃ 的 LB 培养基充分混匀,倒入培养皿中制成带菌平板,每板中心放 1 个牛津杯,杯中加入 200 μL 待测样品,每处理 3 次重复,放入 28℃ 培养箱中,24 h 后观察菌株生长情况,并用十字交叉法测量抑菌圈直径。

1.2.3 链霉菌 SY-L12 摇瓶发酵条件优化 以 5% 接种量将链霉菌 SY-L12 接入高氏一号液体培养基中,进行摇床培养,设置 20、23、25、28、30、32、35℃ 7 个不同摇床温度,80、100、120、150、180、200、220 r·min⁻¹ 7 个不同摇床转速,培养 2~14 d 每天取样,采用液体共培养法测定链霉菌 SY-L12 发酵上清液的抑菌活性,以优化链霉菌的最佳发酵条件。

1.2.4 盆栽药效试验 以优化出的链霉菌 SY-L12 最佳发酵条件进行发酵获得发酵液,去除菌体并稀释后均匀喷施于一年生猕猴桃种苗叶片,每处理 5 株,1 d 后针刺造成伤口并接种猕猴桃溃疡病菌 PA-203 菌悬液,直至水滴滴下,100% 保湿 48 h 后放置于 75%~85% 湿度环境中,7 d 后调查发病情况,调查方法及病情指数划分参考 CELLINILA 等^[9]的方法,计算相对防效。分级标准:0 级,叶片健康;1 级,<1% 叶面积受损;2 级,1%~2% 叶面积受损;3 级,3%~4% 叶面积受损,病斑聚结;4 级,5%~10% 叶面积受损,病斑扩展至叶脉;5 级,>10% 叶面积受损。病情指数=Σ(各级病叶数×各级代表值)/(调查总叶数×最高级代表值);相对防效(%)=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100。

1.3 数据分析

采用 SPSS 18.0 软件对试验数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 链霉菌 SY-L12 对猕猴桃溃疡病的抑制作用

由表 1 可知,链霉菌 SY-L12 发酵液对猕猴桃溃疡病菌生长具有明显抑制作用,共同培养 12 h 后,发酵液原液及 10、50 倍稀释液对猕猴桃溃疡病菌抑制率均达 90% 以上,24 h 后猕猴桃溃疡病菌生长达稳定期,而链霉菌 SY-L12 对其抑制作用表现增强,同浓度处理剂对猕猴桃溃疡病菌抑制率均高于 12 h 的抑制率,说明链霉菌 SY-L12 在 24 h 时对病原菌的抑制效果最强,且 100 倍以下稀释液都具有一定抑菌作用,尤其 50 倍以下时抑制效果显著。

另外在抑菌圈法测试链霉菌 SY-L12 发酵液抑菌效果试验中,链霉菌 SY-L12 发酵液原液,10、50、100 倍稀释液对猕猴桃溃疡病产生抑菌圈直径分别为 13.5、12.2、10.2、5.8 mm,随发酵液稀释倍数增加抑菌圈直径随之减少。

2.2 链霉菌 SY-L12 摇瓶发酵条件优化

2.2.1 摇床温度对链霉菌 SY-L12 抑菌作用的影响

由图 1 可知,25~28℃ 条件下发酵液的抑菌活性

表 1 链霉菌 SY-L12 发酵液对猕猴桃溃疡病菌的抑制作用

Table 1 Inhibition effects of *Streptomyces* sp. SY-L12 on *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

处理 Treatment	12 h OD ₆₀₀	抑制率 Inhibition rate/%	24 h OD ₆₀₀	抑制率 Inhibition rate/%	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm
原液 Fermented liquid	0.050	92.3Aa	0.069	94.0Aa	13.5Aa
10 倍稀释液 10-fold dilution	0.052	92.0Aa	0.080	93.1Bb	12.2Bb
50 倍稀释液 50-fold dilution	0.061	90.6Bb	0.095	91.7Cc	10.2Cc
100 倍稀释液 100-fold dilution	0.146	77.6Cc	0.233	79.8Dd	5.8Dd
对照 CK	0.653	—	1.152	—	0.0

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level; different capital letters indicate highly significant difference at 0.01 level. The same below.

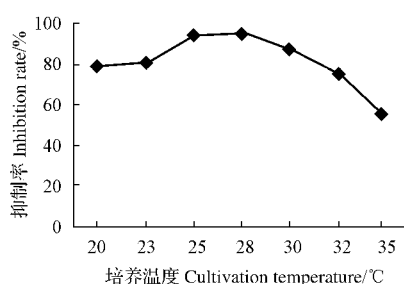


图 1 培养温度对链霉菌 SY-L12 抑菌率的影响

Fig. 1 Effect of cultivation temperature on inhibition rate of SY-L12

最好,即该温度范围最利于活性物质的生产,高于 30℃ 培养抑菌活性明显下降。

2.2.2 摇床转速对链霉菌 SY-L12 抑菌作用的影响

由图 2 可知,摇床转速对链霉菌 SY-L12 的抑菌活性影响较大,转速过低或过高均不利链霉菌 SY-L12 活性物质的生产,高转速 220 r·min⁻¹ 下发酵液抑菌率只有 30%,摇床转速在 120~180 r·min⁻¹ 时,菌株的抑菌活性较高,150 r·min⁻¹ 是最佳摇床转速。

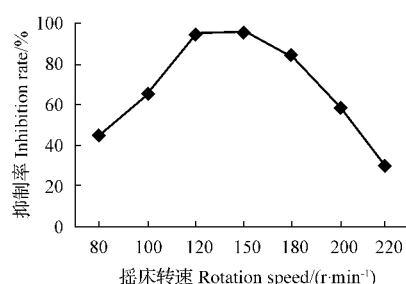


图 2 摇床转速对链霉菌 SY-L12 抑菌率的影响

Fig. 2 Effect of rotation speed on inhibition rate of SY-L12

2.2.3 培养时间对链霉菌 SY-L12 抑菌作用的影响

由图 3 可知,链霉菌 SY-L12 在培养 8 d 以后才具有很好的抑菌活性,可见培养前期是菌株生长期,而后菌株开始产生活性物质,到第 8 天时活性物质产

生量达最大,随后链霉菌 SY-L12 抑菌效果趋于平缓,到第 14 天时稍有下降,因此该菌株最佳培养时间是 8~9 d。

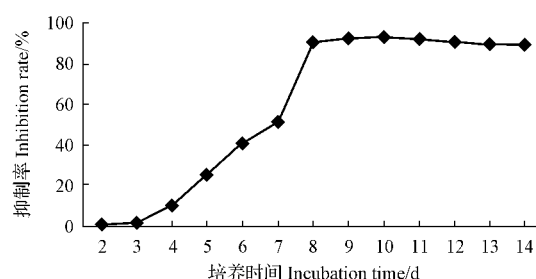


图 3 培养时间对链霉菌 SY-L12 抑菌率的影响

Fig. 3 Effect of incubation time on inhibition rate of SY-L12

2.3 盆栽防效

使用最佳发酵条件下获得的 SY-L12 发酵液进行猕猴桃溃疡病苗木叶片接种盆栽防治试验,由表 2 可知,发酵原液及 10 倍稀释液防效很好,其中原液防效达 85.2%,高于对照药剂氢氧化铜 46% 水分散粒剂。

表 2 盆栽试验防治效果

Table 2 Bio-control effect of *Streptomyces* sp.

SY-L12 in potted trails			
处理 Treatment	稀释倍数 Dilution	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect/%
链霉菌 SY-L12 发酵液 Fermented liquid	—	9.1	85.2
	10	16.5	73.2
	50	24.4	60.3
	100	30.4	50.6
氢氧化铜 46% 水分散粒剂 Copperhydroxide 46% WG	700	20.8	66.2
对照(CK)	—	61.6	—

3 结论与讨论

链霉菌 SY-L12 是沈阳化工研究院有限公司生物与医药研究室从渤海湾海边土壤中分离获得的具有广谱抑菌活性的放线菌,对水稻纹枯病、玉米锈病等多种真菌病害具有明显抑菌作用,初步鉴定为链霉菌属,该试验进行了链霉菌 SY-L12 对猕猴桃溃疡

病菌的抑制作用研究,利用酶标仪直接读取接种病原菌与药剂混合培养液的吸光值,进而判断药剂对病原菌的抑制作用,与国内传统对峙法相比,同批次测试样本量大、试验周期短、操作方便,可通过吸光度值直接反映药剂药效。结果表明链霉菌 SY-L12 发酵液处理 24 h 时对猕猴桃溃疡病抑制作用最强,其发酵液原液抑制率最高达 94.0%,10、50 倍稀释液处理对猕猴桃溃疡病抑制率也均达 90% 以上。此外盆栽防效试验中,在最优发酵条件下生产出的发酵原液及 10 倍稀释液防治猕猴桃溃疡病效果很好,原液防效达 85.2%,优于对照药剂氢氧化铜 46% 水分散粒剂的防效,其田间防效及最佳施用方法可进一步探索和验证。

由于猕猴桃溃疡病是猕猴桃栽培中最具毁灭性病害之一,近年发病率逐年上升,严重者造成毁园,目前尚无有效防治方法。由于该病是细菌性病害,常用化学药剂为农用链霉素、铜制剂等传统农药,但防治效果不显著,因此在猕猴桃溃疡病防治措施中安全、有效的替代药剂是重中之重。该研究利用海洋资源获得一株链霉菌对猕猴桃溃疡病表现出良好防治效果,不同于其它内生放线菌 gCLA4A、C-411^[10] 等菌株,链霉菌 SY-L12 来源于海洋,其次生代谢产物很有可能具有特殊功能和结构,这有待进一步深入解析和研究,因此链霉菌 SY-L12 在猕猴桃溃疡病综合防治中具有继续开发潜力,并提供新的有效防治策略。

(该文作者还有樊金哲、魏婷婷、焦姣、辛雪成,单位同第一作者。)

参考文献

- [1] GUSTAVO D L, MATTEO E, FRANCESCO M, et al. Isolation and partial characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of kiwifruit bacterial canker[J]. Journal Basic Microbiol, 2014, 54: 1-12.
- [2] MARSILIO R, PAUL C, ANNA R T. Bacterial canker on kiwifruit in Italy: Anatomical changes in the wood and in the primary infection sites[J]. Bacteriology, 2012, 102(9): 827-840.
- [3] LI L B, DAN W J, TAN F F, et al. Synthesis and antibacterial activities of yanglingmycin analogues[J]. Chem Pharm Bull, 2015, 63: 33-37.
- [4] 申哲, 黄丽丽, 涂璇, 等. 植物内生放线菌活性物质防治猕猴桃溃疡病[J]. 中国生物防治, 2008, 24(4): 329-334.
- [5] ALAN C, de ZOYSA G H, VIJAYALEKSHMI S. Antimicrobial peptides against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Erwinia amylovora*: Chemical synthesis, secondary structure efficacy, and mechanistic investigations[J]. Peptide Science, 2013, 102(1): 88-96.
- [6] MARCO S. Field efficacy of chitosan to control *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of kiwifruit bacterial canker[J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 140(4): 887-892.
- [7] 苏婷, 王桂跃, 谢关林. 壳聚糖对青枯劳尔氏菌生长及其生物膜形成的影响[J]. 植物保护, 2013, 39(1): 89-92.
- [8] 张继文, 杨春平, 姬志勤, 等. 苦皮藤内生真菌 Hd3 菌株抑菌活性成分分离及结构鉴定[J]. 农药学报, 2009, 11(2): 225-229.
- [9] CELLINILA, FIORENTINIL L, BURIANIL G, et al. Elicitors of the salicylic acid pathway reduce incidence of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*[J]. Annals of Applied Biology, 2014, 165: 441-453.
- [10] 赵娜, 王海丽, 魏少鹏, 等. 放线菌 C-411 发酵液抑菌活性及活性成分[J]. 植物保护学报, 2013, 40(1): 73-77.

Control Efficacy of *Streptomyces*. sp SY-L12 on *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Causal Agent of Kiwifruit Bacterial Canker

WANG Fang¹, LI Dan¹, ZHANG Xinwang², LI Jiguang¹, ZHOU Fan¹, JIN Xixuan²,
FAN Jinzhe¹, WEI Tingting¹, JIAO Jiao¹, XIN Xuecheng¹

(1. Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co. Ltd., Shenyang, Liaoning 110021; 2. Sichuan Engineering and Technology Research Center of Kiwifruit, Chengdu, Sichuan 611600)

Abstract: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* was used as test fungi, the inhibition effect of *Streptomyces*. sp SY-L12 on *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* was assessed by using co-culture and inhibition-zone methods. Then the control effect was studied in potted trails. The results showed that *Streptomyces*. sp SY-L12 inhibited the growth of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* with the inhibitory rate 94.0%. The best efficacy was found when *Streptomyces*. sp SY-L12 was grown at 28 °C with shaking at 150 r · min⁻¹ for 8—9 days, the efficacy of fermentation broth was 85.4% which was higher than the control in potted trails. Therefore *Streptomyces*. sp SY-L12 might be considered as a new option for developing new integrated control strategies to reduce the disease.

Keywords: actinomycetes; kiwifruit bacterial canker; antimicrobial activity; bio-control